

氏 名 (本籍)	橋 本 一 浩 (埼玉県)
学位の種類	博士 (学術)
学位記番号	甲第30号
学位授与年月日	平成24年3月15日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	タバコシバンムシ <i>Lasioderma serricorne</i> とマイコトキシン産生真菌の関 係に関する研究
論文審査委員	(主査) 内 田 明 彦 (副査) 後 藤 純 雄 福 山 正 文

論 文 内 容 の 要 旨

タバコシバンムシは食品工場や一般住宅で発生し、乾燥動植物質を食害する微小甲虫である。これまでの研究により、一般住宅の屋内およびその周辺環境でごく普通に捕獲されること、また多くの真菌や病原細菌を保持していることが明らかにされ、シバンムシがこれらの微生物を伝搬している可能性が指摘されている。筆者は、シバンムシからオクラトキシン産生能を有する *Aspergillus ochraceus* が高頻度に分離されることをこれまでに報告してきた。

シバンムシに関する研究報告は多く見られるが、シバンムシの生態については解明されていない点が多々ある。特に日常における棲息場所については最大の謎であり、自然界での繁殖場所等はもちろん、主要な棲息場所が屋内であるのか屋外であるのかも不明である。本研究では、住宅において捕獲された虫体における真菌相と、その住宅の周辺環境の真菌相を比較することで、シバンムシの棲息場所が屋内に依存するのか、それとも屋外に依存するのかを突きとめることを目的とした。また、過去の研究によりシバンムシから多数分離されている *A. ochraceus* に焦点を当て、その毒性およびDNAタイプを明らかにすることにより、シバンムシと真菌の共生・寄生の関係について調べた。

シバンムシの捕獲は2010年7月中旬から同年9月中旬の間に、東京都小平市の戸建A宅および埼玉県上尾市の戸建B宅の一般住宅2軒を対象として行った。捕獲されたシバンムシから真菌の分離を試みたところ、供試した294個体中278個体(94.6%)から真菌が分離され、黒色真菌グループ(*Exophiala* 属、*Fonsecaea* 属、*Phialophora* 属など)がA宅で114個体中65個体(57.0%)、B宅で180個体中120個体(66.7%)と高率に分離され、*A. ochraceus* がA宅で6個体(5.3%)、B宅で27個体(15.0%)と特異的に分離された。

シバンムシの捕獲を行った住宅の空中浮遊真菌を捕集し、環境中の真菌相を調べたところ、*Aspergillus section Restricti* がA宅屋内で43.3CFU/m³ (I/O比=6.8)、B宅屋内で229.4CFU/m³ (I/O

比 = 98.3) と高濃度であり、シバンムシから高率に分離された黒色真菌グループや *A. ochraceus* の空気中濃度は低かった。また、調査住宅の周辺土壌を採取し、真菌の分離を試みたところ、A 宅の土壌からは、5 箇所中 1 箇所 (20%) から分離され、B 宅では 5 箇所中 4 箇所 (80%) から分離された。

シバンムシの体表面から多く分離された黒色真菌グループや *A. ochraceus* は土壌中や腐朽植物など屋外に多い点、また、屋内環境中で多く見られた *A. section Restricti* のシバンムシからの分離率が低いことから、シバンムシは生活の大部分を屋外、特に黒色真菌グループが分布する腐朽植物や腐葉土などで過ごしていると考えられる。シバンムシは長期間に渡って屋内に定着しているわけではなく、あくまでも外部から侵入してきて、餌や繁殖場所の探索のために屋内を通過しているに過ぎないことが示唆された。

以上の調査で分離された *A. ochraceus* 60 株について、オクラトキシン A (OTA) およびオクラトキシン B (OTB) の産生量を LC/MS/MS にて定量した。さらに、これら *A. ochraceus* のミトコンドリア・チトクローム b (Cytb) 遺伝子および 26SrRNA 遺伝子 D1/D2 領域の塩基配列を解析し、DNA タイプを分類した。

分析した *A. ochraceus* 60 株のうち OTA が検出されたのは 46 株 (76.7%) で平均産生量は大麦 5g あたり 1463 μ g であった。また、OTB は 37 株 (61.7%) から検出され、平均産生量は大麦 5g あたり 118 μ g であった。OTA はオクラトキシン類の中でも特に強い腎発癌性を示し、IARC では OTA の発癌性をグループ 2B (ヒトに対する発癌の可能性有り) に指定している。OTA 産生種は *A. ochraceus* の他に *A. carbonarius*、*Penicillium verrucosum* などが知られている。ヨーロッパでは *A. carbonarius* や *P. verrucosum* が食品中の OTA 汚染の主な原因菌とされるが、これらは日本国内における分布は少なく、OTA 産生量も 100ppm に満たない菌株がほとんどである。この結果から、国内における OTA 汚染の主な原因菌は *A. ochraceus* であると考えられる。*A. ochraceus* の Cytb 遺伝子のタイプは AO-1、AO-2、AO-3、AO-3-2 および AO-4 に分類され、26SrRNA 遺伝子 D1/D2 領域では、D1D2-1、D1D2-2 および D1D2-3 に分類された。Cytb 遺伝子で AO-1、AO-2、AO-3 および AO-3-2 に分類される菌株は、D1/D2 領域では D1D2-1 に分類された。また、Cytb 遺伝子で AO-4 に分類される菌株は、D1/D2 領域で D1D2-2 および D1D2-3 のいずれかに分類された。多量の OTA を産生する *A. ochraceus* は、AO-4 (ミトコンドリア Cytb 遺伝子による分類)、D1D2-2 および D1D2-3 (26SrRNA 遺伝子 D1/D2 領域による分類) に属し、分離菌株の多くがこれらのタイプに分類されることが明らかとなった。それ以外の遺伝子タイプに分類された菌株の OTA 産生量はいずれも検出下限を下回った。

食品害虫のシバンムシからは *A. ochraceus* が特異的に分離されており、これらの分離株の多くは AO-4 に分類され、OTA 産生株であった。貯蔵穀類など食品における OTA 汚染に関して、シバンムシがトキシン産生株を運搬している可能性が明らかとなった。

また、シバンムシから分離された *A. ochraceus* (AO-4) の平均 OTA 量は 1564 μ g/5g (n = 34) であったのに対し、空中から分離された *A. ochraceus* (AO-4) の平均 OTA 量は 2266 μ g/5g (n = 11) と虫体由来株の OTA 産生量の方が有意に低かった (Mann-Whitney - U 検定; Z = 107, p < 0.05)。これは、

次のような原因が考えられる。①虫体に多量のOTAを産生する*A. ochraceus*分生子が付着すると、比較的早期に死亡する傾向にある。つまり、強毒株を保有する個体はトラップに辿り着く前に息絶えてしまうものが多く、結果的に強毒株の回収率は減少する。②多量のOTAを産生する*A. ochraceus*をシバンムシが避ける傾向にある。

真菌がマイコトキシンを産生する理由は解明されていないが、①の場合、キャリアーを殺して、キャリアーを「培地」として発育するために、マイコトキシンを利用していることが考えられる。②の場合、OTAの代謝量に比例して、シバンムシに対し忌避効果を有するMVOC（微生物有機揮発性化合物）を発生させていることが考えられる。

本研究により、タバコシバンムシの主な棲息場所が屋外であること、シバンムシから分離される*A. ochraceus* (AO-4) のOTA産生量が低い傾向にあることなどの新事実が明らかにされた。

論文審査の結果の要旨

タバコシバンムシは食品工場や一般住宅で発生し、乾燥動植物質を食害する微小甲虫である。これまでの研究により、一般住宅の屋内およびその周辺環境でごく普通に捕獲されること、また多くの真菌や病原細菌を保持していることが明らかにされ、シバンムシがこれらの微生物を伝搬している可能性が指摘されている。筆者は、シバンムシからオクラトキシン産生能を有する*Aspergillus ochraceus*が高頻度に分離されることをこれまでに報告してきた。

シバンムシに関する研究報告は多く見られるが、シバンムシの生態については解明されていない点が多々ある。特に日常における棲息場所については最大の謎であり、自然界での繁殖場所等はもちろん、主要な棲息場所が屋内であるのか屋外であるのかも不明である。本研究では、住宅において捕獲された虫体における真菌相と、その住宅の周辺環境の真菌相を比較することで、シバンムシの棲息場所が屋内に依存するのか、それとも屋外に依存するのかを突きとめることを目的とした。また、過去の研究によりシバンムシから多数分離されている*A. ochraceus*に焦点を当て、その毒性およびDNAタイプを明らかにすることにより、シバンムシと真菌の共生・寄生の関係について調べた。

シバンムシの捕獲は2010年7月中旬から同年9月中旬の間に、東京都小平市の戸建A宅および埼玉県上尾市の戸建B宅の一般住宅2軒を対象として行った。捕獲されたシバンムシから真菌の分離を試みたところ、供試した294個体中278個体（94.6%）から真菌が分離され、黒色真菌グループ（*Exophiala*属、*Fonsecaea*属、*Phialophora*属など）がA宅で114個体中65個体（57.0%）、B宅で180個体中120個体（66.7%）と高率に分離され、*A. ochraceus*がA宅で6個体（5.3%）、B宅で27個体（15.0%）と特異的に分離された。

シバンムシの捕獲を行った住宅の空中浮遊真菌を捕集し、環境中の真菌相を調べたところ、*Aspergillus section Restricti*がA宅屋内で43.3CFU/m³（I/O比＝6.8）、B宅屋内で229.4CFU/m³（I/O比＝98.3）と高濃度であり、シバンムシから高率に分離された黒色真菌グループや*A. ochraceus*の空气中濃度は低かった。また、調査住宅の周辺土壌を採取し、真菌の分離を試みたところ、A宅の土壌か

らは、5箇所中1箇所（20％）から分離され、B宅では5箇所中4箇所（80％）から分離された。

シバンムシの体表面から多く分離された黒色真菌グループや *A. ochraceus* は土壌中や腐朽植物など屋外に多い点、また、屋内環境中で多く見られた *A. section Restricti* のシバンムシからの分離率が低いことから、シバンムシは生活の大部分を屋外、特に黒色真菌グループが分布する腐朽植物や腐葉土などで過ごしていると考えられる。シバンムシは長期間に渡って屋内に定着しているわけではなく、あくまでも外部から侵入してきて、餌や繁殖場所の探索のために屋内を通過しているに過ぎないことが示唆された。

以上の調査で分離された *A. ochraceus* 60株について、オクラトキシンA（OTA）およびオクラトキシンB（OTB）の産生量をLC/MS/MSにて定量した。さらに、これら *A. ochraceus* のミトコンドリア・チトクロームb（Cytb）遺伝子および26SrRNA遺伝子D1/D2領域の塩基配列を解析し、DNAタイプを分類した。

分析した *A. ochraceus* 60株のうちOTAが検出されたのは46株（76.7％）で平均産生量は大麦5gあたり1463 μ gであった。また、OTBは37株（61.7％）から検出され、平均産生量は大麦5gあたり118 μ gであった。OTAはオクラトキシン類の中でも特に強い腎発癌性を示し、IARCではOTAの発癌性をグループ2B（ヒトに対する発癌の可能性有り）に指定している。OTA産生種は *A. ochraceus* の他に *A. carbonarius*、*Penicillium verrucosum* などが知られている。ヨーロッパでは *A. carbonarius* や *P. verrucosum* が食品中のOTA汚染の主な原因菌とされるが、これらは日本国内における分布は少なく、OTA産生量も100ppmに満たない菌株がほとんどである。この結果から、国内におけるOTA汚染の主要な原因菌は *A. ochraceus* であると考えられる。*A. ochraceus* のCytb遺伝子のタイプはAO-1、AO-2、AO-3、AO-3-2およびAO-4に分類され、26SrRNA遺伝子D1/D2領域では、D1D2-1、D1D2-2およびD1D2-3に分類された。Cytb遺伝子でAO-1、AO-2、AO-3およびAO-3-2に分類される菌株は、D1/D2領域ではD1D2-1に分類された。また、Cytb遺伝子でAO-4に分類される菌株は、D1/D2領域でD1D2-2およびD1D2-3のいずれかに分類された。多量のOTAを産生する *A. ochraceus* は、AO-4（ミトコンドリアCytb遺伝子による分類）、D1D2-2およびD1D2-3（26SrRNA遺伝子D1/D2領域による分類）に属し、分離菌株の多くがこれらのタイプに分類されることが明らかとなった。それ以外の遺伝子タイプに分類された菌株のOTA産生量はいずれも検出下限を下回った。

食品害虫のシバンムシからは *A. ochraceus* が特異的に分離されており、これらの分離株の多くはAO-4に分類され、OTA産生株であった。貯蔵穀類など食品におけるOTA汚染に関して、シバンムシがトキシン産生株を運搬している可能性が明らかとなった。

また、シバンムシから分離された *A. ochraceus*（AO-4）の平均OTA量は1564 μ g/5g（n = 34）であったのに対し、空中から分離された *A. ochraceus*（AO-4）の平均OTA量は2266 μ g/5g（n = 11）と虫体由来株のOTA産生量の方が有意に低かった（Mann-Whitney-U検定；Z = 107、p < 0.05）。

本研究により、タバコシバンムシの主な棲息場所が不明であったが屋外であること、一般に *A. ochraceus* はOTA産生量が高いが、シバンムシから分離される *A. ochraceus*（AO-4）のOTA産生量が

低い傾向にあることなどの新事実が明らかにされたことから本研究は、主査、副査の審査において、麻布大学大学院環境保健学研究科の博士（学術）にふさわしい内容であると審査委員一同が認めた。